



Universitat  
Autònoma  
de Barcelona



UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA  
FACULTAT DE MEDICINA  
DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA, DE TERAPÈUTICA I DE  
TOXICOLOGIA

## **DESARROLLO DE UN MODELO IN VIVO MURINO DE ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN MIOCÁRDICA**

Memoria del trabajo experimental realizado por Marcos Poncelas Nozal en el Laboratorio de Cardiología Experimental del Institut de Recerca del Hospital Universitari Vall d'Hebron bajo la dirección del Dr. David García-Dorado García, la co-dirección del Dr. Javier Inserte Igual y con la tutoría de la Dra. Elisabet Vila.

Mayo del 2010

Marcos Poncelas Nozal

El Dr. David García-Dorado García certifica que el trabajo experimental con título, **“Desarrollo de un modelo *in vivo* murino de isquemia y reperfusión miocárdica”**, ha sido realizado por Marcos Poncelas Nozal bajo su dirección, la co-dirección del Dr. Javier Inserte Igual y con la tutoría de la Dra. Elisabet Vila. Este trabajo se presenta para obtener los 12 créditos del período de investigación dentro del programa de Doctorado en Farmacología, impartido por el Departamento de Farmacología, de Terapéutica y de Toxicología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona.

Barcelona, Mayo de 2010.

Firmado,

Autor:  
Marcos Poncelas Nozal

Director:  
Dr. David García-Dorado

Co-director:  
Dr. Javier Inserte Igual

Tutora:  
Dra. Elisabet Vila

# ÍNDICE

<b>RESUMEN .....</b>	<b>4</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>5</b>
<b>OBJETIVO .....</b>	<b>8</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>9</b>
1. ANIMALES .....	9
2. ANESTESIA Y VENTILACIÓN .....	10
2.1. <i>Anestesia</i> .....	10
2.2. <i>Intubación y ventilación</i> .....	11
3. MONITORIZACIÓN DEL ANIMAL .....	12
4. CANULACIÓN .....	13
5. PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO .....	14
6. TRATAMIENTO POSTQUIRÚRGICO.....	18
7. PROCESADO DE LOS CORAZONES .....	19
8. DETERMINACIÓN DEL ÁREA EN RIESGO (AR) Y DEL ÁREA DE INFARTO (AI) .....	21
9. CÁLCULO DEL EDEMA TISULAR.....	21
10. HEMODINÁMICA .....	22
11. ECOCARDIOGRAFÍA.....	22
12. EUTANASIA.....	23
13. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	23
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>24</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>31</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>33</b>
<b>APÉNDICE .....</b>	<b>35</b>

## RESUMEN

La muerte celular secundaria a la isquemia/reperfusión (I/R) es el principal determinante del impacto de la cardiopatía isquémica sobre la supervivencia y la calidad de vida. En aquellos pacientes que sufren un infarto de miocardio (IM), entender los procesos causantes de esta muerte es esencial para desarrollar estrategias capaces de prevenirla. La reciente disponibilidad de cepas de ratones transgénicos convierte al modelo murino con isquemia transitoria en una herramienta de gran interés para el estudio de los mecanismos fisiopatológicos determinantes de la muerte por I/R. El objetivo de este trabajo experimental ha sido establecer en nuestro laboratorio un modelo de I/R miocárdica *in vivo* en ratón. Tras establecer la técnica quirúrgica se ha seleccionado un tiempo de oclusión de ADA de 45 minutos. El tamaño del infarto como porcentaje del área en riesgo (AR) ha sido de  $33.84 \pm 3.26$  en los ratones sometidos a un protocolo de 24 horas de reperfusión y de  $29.48 \pm 2.68$  en los ratones sometidos a 7 días de reperfusión. La mortalidad registrada en el proceso experimental ha sido del 30%. Estos resultados son comparables con los datos obtenidos de la literatura por lo que se considera el modelo válido para su uso en estudios de I/R con ratones transgénicos disponibles en el laboratorio.

## INTRODUCCIÓN

La cardiopatía isquémica constituye una de las principales causas de muerte e incapacidad en los países industrializados y su prevalencia aumenta continuamente en el conjunto de la población mundial. La muerte de células miocárdicas secundaria a una oclusión coronaria aguda es la responsable directa de la mayoría de las complicaciones que causan la muerte de los pacientes que ingresan en el hospital con un síndrome coronario agudo (SCA).

Una vez que se produce una oclusión coronaria, la reinstauración del flujo coronario o reperusión es una condición indispensable para que no se desencadene la muerte de los cardiomiocitos isquémicos. Cuando la reperusión tiene lugar muy precozmente (antes de que hayan transcurrido aproximadamente 30 minutos de isquemia severa), previene la muerte celular. Si se produce más tardíamente, el efecto final es que salvará una parte del miocardio, tanto menor cuanto más tardíamente se produzca, mientras que se morirá el resto. Cuando la reperusión se realiza después de varias horas de oclusión ya no modifica apreciablemente el tamaño final del infarto. En la práctica clínica la reperusión se produce casi siempre demasiado tarde para prevenir completamente la muerte celular, pero dentro de un intervalo en el que sí es efectiva en disminuir el porcentaje de células que sin el período de restauración del flujo sanguíneo morirían irremediablemente (1).

Está sólidamente demostrado que cuando la reperusión se realiza durante este intervalo, en el que se salva algo pero no todo el miocardio isquémico, la muerte celular ocurre predominantemente durante los primeros minutos después de la restauración del flujo sanguíneo, en forma de necrosis, y por mecanismos desencadenados por la reperusión y no por la isquemia previa (2). Este hecho es de gran importancia porque ofrece la posibilidad de añadir en el momento de la reinstauración del flujo tratamientos farmacológicos que aumenten la eficacia de la reperusión. El desarrollo de tratamientos eficaces y clínicamente aplicables para la prevención de la muerte celular por reperusión constituye un objetivo prioritario en la lucha para disminuir el impacto socio sanitario de la cardiopatía isquémica. Sin embargo, el conocimiento actual de los mecanismos celulares y moleculares responsables de este tipo de muerte celular, aunque ha progresado muy rápidamente en los últimos años, es todavía muy incompleto y, hasta

el momento, en la práctica las diferentes estrategias probadas con este fin sólo han demostrado su utilidad en condiciones experimentales.

Los modelos animales que imitan las características y la evolución del SCA y del infarto de miocardio (IM) en humanos son indispensables para el estudio de los mecanismos fisiopatológicos causantes de la muerte por reperfusión. En un modelo animal, la inducción de la patología cardíaca se debe reproducir con características funcionales y estructurales similares al trastorno observado en humanos. En el caso del SCA, lo que se busca reproducir es un estrechamiento crónico u oclusión aguda de las arterias coronarias por la aparición de la placa de ateroma (3). De acuerdo con esto, se han desarrollado diversos métodos aplicados en animales de laboratorio para inducir el estrechamiento u oclusión de la arteria coronaria (4, 5, 6). Sin embargo, el momento en el que se produce la oclusión coronaria y el lugar exacto mediante el uso de este método experimental son al azar, lo que supone un factor muy importante no controlado por el investigador. Esta falta de inducibilidad y predicción de la enfermedad también es un problema asociado a algunos modelos de arterioesclerosis o insuficiencia cardíaca basados exclusivamente en la manipulación de determinados genes (7). Por contra, la inducción quirúrgica del IM mediante la oclusión aguda de las arterias coronarias en modelos animales tiene la ventaja de controlar el lugar, el momento y la duración de la oclusión coronaria así como de la reperfusión según el criterio del investigador, además de posibilitar la obtención de una mayor reproducibilidad en las variables estudiadas (8). Por todo ello, éste es el modelo experimental más extendido para el estudio de los mecanismos causantes de la muerte miocárdica que se produce tras una oclusión transitoria.

El continuo desarrollo de nuevas cepas de ratones modificados genéticamente y su cada vez mayor accesibilidad hacen de estos una herramienta muy útil para el estudio de los mecanismos responsables de la muerte por I/R. Sin embargo, la utilización de ratones para experimentos de oclusión coronaria transitoria, especialmente con supervivencia, representa un importante reto tecnológico al alcance de pocos laboratorios. El primer modelo de IM en ratón fue descrito por Zolotareva A. G. et al. en 1978 (9). Más adelante, Lloyd H. Michael et al. fueron los primeros en describir un modelo de ligadura de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (ADA) para inducir un IM en ratón (10). En el trabajo experimental que se presenta a continuación, se detalla como se ha desarrollado un modelo de I/R miocárdica in vivo en ratón tomando como punto de partida un protocolo previo realizado en rata en el Laboratorio

de Cardiología Experimental del Institut de Recerca del Hospital Universitari Vall d'Hebron (IRHUVH, Barcelona, España) (11). El objetivo es realizar una oclusión transitoria de ADA en ratón con supervivencia prolongada para poder estudiar el daño por reperfusión a largo plazo. Este protocolo permite realizar estudios *in vivo* en un corazón *in situ* evitando así alejarse de lo que ocurre en humanos, como sucede en otros modelos ampliamente utilizados como son el corazón aislado y perfundido en un sistema Langendorff o los cultivos celulares. Se ha seleccionado el ratón como modelo experimental para el estudio del daño miocárdico por I/R por diferentes motivos: a) se trata del modelo animal con menor sensibilidad neurovegetativa que nos permite realizar experimentos de isquemia miocárdica *in vivo* con reperfusiones prolongadas, proporcionando además, la posibilidad de obtener datos ecocardiográficos y funcionales; b) a diferencia de lo que ocurre en otras especies incluida la rata, se ha conseguido secuenciar su genoma completo y actualmente existe una gran variedad de animales transgénicos que permiten investigar las vías moleculares en el daño por I/R (7). Nuestro laboratorio dispone de diferentes cepas de ratones transgénicos de interés, incluyendo animales con alteraciones específicas a nivel celular o de expresión génica cardioespecífica e inducible; c) los costes de mantenimiento del ratón son significativamente más bajos que para la rata (10), característica importante dado que se pretende evaluar las alteraciones fisiopatológicas causadas por la I/R a largo plazo, como es el caso del remodelado ventricular (12).

Para el desarrollo del protocolo de I/R miocárdica *in vivo* en ratón se llevó a cabo un extenso y minucioso estudio bibliográfico probando varias de las técnicas descritas hasta conseguir un protocolo propio y estandarizado.

## OBJETIVO

- Desarrollo y puesta en funcionamiento de un modelo *in vivo* murino de I/R miocárdica adecuado para la posterior utilización de animales transgénicos dirigidos a analizar los mecanismos celulares y/o moleculares implicados en el daño por perfusión.



## MATERIALES Y MÉTODOS

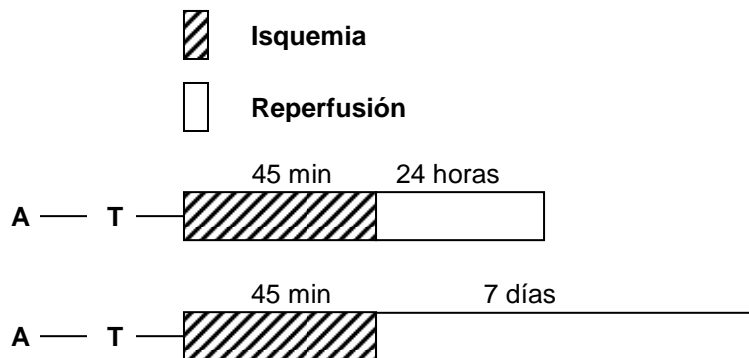
Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal (CEEa) del IRHUVH. Todo el proceso experimental se ha llevado a cabo en el Estabulario del IRHUVH. Estas instalaciones cumplen las normas de factores ambientales y nutrición siguiendo las recomendaciones de la *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA) y del CEEa. La cirugía de I/R en ratón se ha llevado a cabo en los quirófanos para roedores del estabulario, equipados con toma de O<sub>2</sub>, vacío y CO<sub>2</sub>.

### 1. Animales

Los animales de experimentación utilizados fueron ratones, tanto machos como hembras, por un lado de la cepa C57BL/6NCrl, y por otro lado ratones albinos CD1 White (ICR). En ambos casos los animales tuvieron una edad comprendida entre 8-12 semanas, 20-40 g de peso y fueron comprados a Harlan Ibérica, España.

Antes de someterlos a la cirugía fueron aclimatados durante 1 semana en las salas del estabulario del IRHUVH controlando la temperatura ( $22 \pm 2$  °C), la humedad ( $55 \pm 10\%$ ) y aplicando un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas (encendido de luces a las 08:00). Antes y después de la cirugía los animales recibieron una dieta de pellets comerciales y agua *ad libitum*.

Los experimentos se llevaron a cabo desde Marzo de 2009 hasta Abril de 2010, utilizando un total de 119 ratones hasta completar el desarrollo completo del protocolo experimental. Estos ratones se dividieron en dos grupos: ratones *Sham* (ratones sometidos al estrés quirúrgico pero sin oclusión transitoria de ADA) y ratones I/R sometidos al protocolo de oclusión de ADA y posterior reperusión. Los ratones I/R se subdividieron a su vez en dos grupos: ratones sometidos a un período de reperusión de 24 horas (I/R 24h) y ratones sometidos a un período de reperusión de 7 días (I/R 7d) (Fig. 1)



**Fig. 1.** Protocolos experimentales utilizados en el desarrollo del modelo de I/R miocárdica *in vivo* en ratón. A se corresponde con el período de anestesia y T se corresponde con la fase de apertura de tórax.

## 2. Anestesia y ventilación

### 2.1. Anestesia

En la inducción de la anestesia se utilizó pentobarbital sódico en una concentración de 70 mg/Kg vía intraperitoneal. La preparación de la solución anestésica se hizo en el momento de ser utilizada. El refuerzo anestésico suministrado, siempre y cuando el animal diera muestras de superficialización de la anestesia (aparición de reflejo podal, reflejo ocular o reflejo en el cartílago de la oreja), fue del 30% de la dosis inicial.

Una vez que el animal es anestesiado para evitar pérdidas extremas de agua y electrolitos se le debe administrar NaCl al 0.9% (Meinsol, Fresenius Kabi España) en cantidades ajustadas según su peso corporal. Basándonos en el criterio establecido para la hidratación de prematuros extremos (13), en condiciones de ayuno (precirugía) se le suministraron 0.04 mL/10g/h de NaCl al 0.9%, mientras que durante la cirugía se le suministraron 0.1 mL/10g/h. A partir del momento en el que se anestesia al animal, se debe controlar la temperatura de forma precisa para que se mantenga entre 35 y 37 °C ya que se ha demostrado que la baja temperatura es cardioprotectora (14). Para ello se utilizó una manta eléctrica con sonda rectal acoplada (HB 101/2, Harvard Apparatus, Estados Unidos) sobre la que se colocó el roedor anestesiado y una lámpara de infrarrojos (Beurer, Alemania) colocada a 45 cm de la parte caudal del animal. Además, se mantuvo un control de la temperatura de la sala de cirugía estableciéndose en un valor constante de  $26 \pm 2$  °C.

## 2.2. Intubación y ventilación

Cuando el animal ya anestesiado perdió el reflejo de consciencia, se procedió a la intubación mediante el uso de un Kit Hallowell de intubación para roedores (Hallowell EMC, Estados Unidos) y un soporte de madera. La cánula utilizada fue un catéter radiopaco 20G (ABBOCATH-T, Hospira, Estados Unidos) con la punta biselada y cortado para conseguir una longitud final de 2.5 cm (15). El procedimiento utilizado para el proceso de intubación se basó en el desarrollado por Robert H. Brown *et al* (1999) y Berul C. I. *et al* (1996) (16, 17). Se colocó al animal en el soporte inclinado de madera en posición decúbito dorsal fijado a la tabla mediante una goma elástica colocada en los incisivos superiores y se aplicó una luz en la parte central del cuello para visualizar por transiluminación los pliegues de la laringe junto con la entrada de la tráquea. Después de apartar la lengua con una pinza atraumática, se introdujo la cánula 20G por la boca con la ayuda de una guía de metal incorporada en el kit de intubación. En este paso se debe tener especial cuidado de no tocar la glotis durante el proceso de intubación con el fin de evitar un edema o la excesiva secreción de moco que dificulte la respiración del roedor y la intubación. Una vez introducida la cánula, para comprobar que entró de forma correcta, se tapó la abertura de esta y se observó si se producía un cambio en el patrón respiratorio del roedor. Comprobado esto, se aplicó en los ojos del ratón una solución methocel 2% (Omnivisión Pharma) para evitar el resecamiento durante la cirugía y se procedió a la ventilación mecánica controlada (VMC) del animal.

En la VMC de nuestros animales se utilizó un ventilador mecánico para roedores (Inspira asv, Harvard Apparatus, Estados Unidos) con un modo de seguridad interno mediante el cual, una vez que introducimos el peso del animal, se calculan automáticamente los parámetros respiratorios óptimos (Tabla 1). Se aplicó una presión positiva al final de la expiración (PEEP) de 3 mbar (1-3 cm de agua), una fracción de O<sub>2</sub> expirado (FiO<sub>2</sub>) de 0,3 y se suministró oxígeno al 100% con un flujo de 1 L/min durante todo el período en el que el animal permaneció con el tórax abierto (18). Como conector entre la cánula de intubación y el ventilador se utilizó una llave en “Y” de tres vías con un espacio muerto de 2-3 cm.

**Tabla 1. Parámetros respiratorios en función del peso del ratón (20-60 g)**

Peso (g)	Vt (mL)	FR (Respiraciones $\times$ min <sup>-1</sup> )
20	0.12	148
25	0.15	141
30	0.18	134
35	0.21	128
40	0.24	124
45	0.27	120
50	0.30	117
55	0.33	114
60	0.36	111

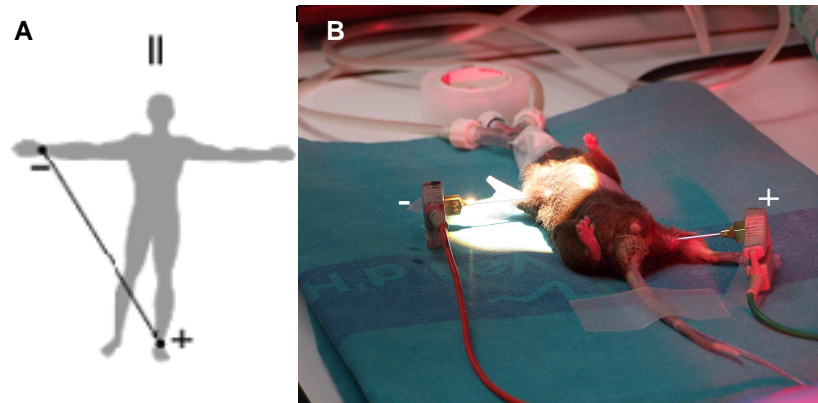
Vt, volumen tidal

FR, frecuencia respiratoria.

Cálculos obtenidos automáticamente mediante el ventilador mecánico para roedores (Inspira asv, Harvard Apparatus)

### 3. Monitorización del animal

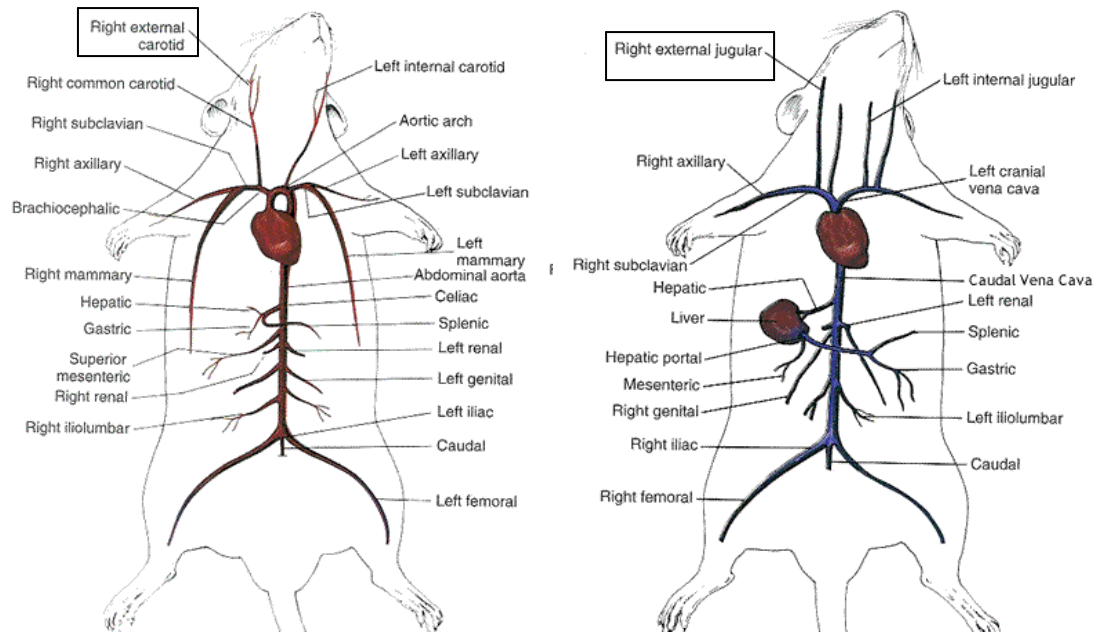
La monitorización de los animales durante el protocolo quirúrgico tiene como finalidad conseguir mantener unos parámetros fisiológicos estables durante el tiempo de duración del proceso, dotarlo de reproducibilidad y conseguir una fiabilidad a la hora de repetir los procedimientos experimentales. Además, con la monitorización se evitan posibles sesgos estadísticos que podrían alterar los datos. Durante todo el protocolo experimental se llevó a cabo un registro del electrocardiograma (ECG) del animal obteniéndose el ciclo cardíaco y la frecuencia cardíaca (FC). Para ello se utilizó un sistema de adquisición de datos biológicos BIOPAC MP100 (Biopac Systems Inc., Estados Unidos) constituido por los siguientes elementos: el programa informático AcqKnowledge en la versión 3.9.0 (Biopac Systems, Inc., Estados Unidos), las unidades externas UIM100A, ECG100C, DA100C y tres electrodos de aguja monopolares colocados subcutáneamente. Los electrodos transportan la señal desde el animal hasta la unidad ECG100C (amplificador para el ECG) y esta finalmente al ordenador. Los electrodos se colocaron en derivación II (Fig. 2) utilizando una toma de tierra colocada en la extremidad superior libre.



**Fig. 2.** **A**, Esquema de ECG en derivación II, donde se coloca el electrodo positivo en la extremidad inferior y el negativo en la extremidad superior contraria. **B**, ratón durante la cirugía con derivación II.

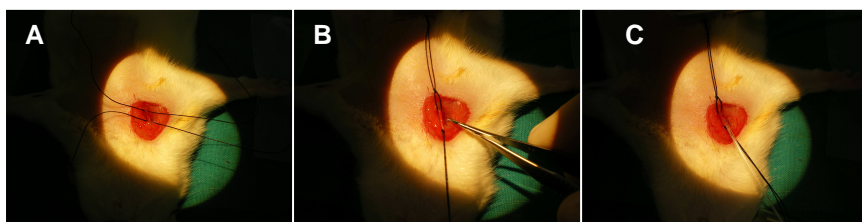
#### 4. Canulación

Se ha efectuado la canulación de la arteria carótida derecha y de la vena yugular derecha (Fig. 3). En el primer caso la finalidad de la canulación es realizar medidas de presión arterial mediante la utilización de un catéter intraventricular de presión-volumen (catéter P-V) (Millar Instruments Inc., Estados Unidos), además de posibilitar la extracción de muestras de sangre arterial para diferentes estudios y la infusión de sustancias, como por ejemplo, el colorante azul de Evan utilizado al final del protocolo para determinar el área en riesgo (AR). En el segundo caso, la canulación permite la infusión de fármacos o fluidos específicos de acuerdo con el protocolo escogido en cada proceso experimental. El procedimiento de canulación fue el mismo para ambos vasos sanguíneos (Fig. 4, A, B y C). El ratón se situó hacia el operador en posición decúbito dorsal. Se utilizó una técnica de disección roma usando unas tijeras quirúrgicas para microdissección. Una vez retirada la piel, se procedió a la separación de las diferentes capas de tejido conectivo y muscular hasta llegar al vaso de interés. Para el caso de la arteria carótida, mediante unas pinzas para microcirugía se aisló primero el nervio vago con especial cuidado de no dañarlo, para a continuación limpiar el vaso de tejido conectivo. Se utilizó un hilo de sutura de seda de calibre 5-0 (Syneture, Estados Unidos) para llevar a cabo la oclusión del vaso sanguíneo en el extremo craneal y para sujetar en el extremo torácico el catéter correspondiente.



**Fig. 3.** Arteria carótida y vena yugular derechas en roedores. (Fuente: [http://www.biologycorner.com/bio3/anatomy/rat\\_circulatory.html](http://www.biologycorner.com/bio3/anatomy/rat_circulatory.html))

La cánula o catéter fue previamente llenado con solución salina heparinizada (Heparina sódica, 200 UI/Kg, Chiesi, Italia). Con unas tijeras iris para microdissección se llevó a cabo una incisión en la zona media del vaso aislado y se introdujo con la ayuda de las pinzas para microdissección la punta biselada de la cánula correspondiente. Una vez que la cánula se colocó 0.7 cm en el interior del vaso sanguíneo, se fijó haciendo un nudo simple con el hilo de sutura.



**Fig. 4.** Canulación de la vena yugular. **A**, aislamiento del vaso. **B**, corte mediante tijeras iris para microcirugía. **C**, introducción del catéter PE-10 y fijación del mismo.

## 5. Procedimiento quirúrgico

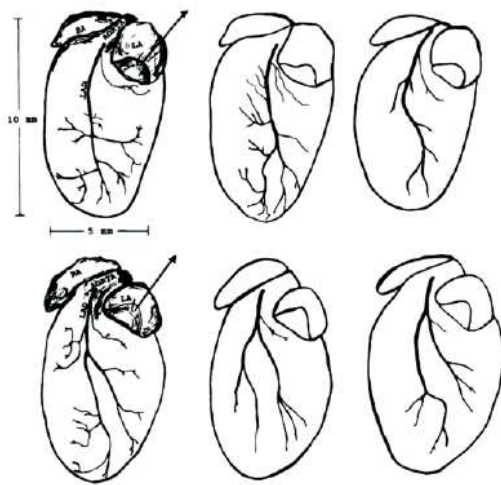
Todo el instrumental quirúrgico utilizado en el protocolo se describe en el apéndice final. Los procedimientos quirúrgicos se llevaron a cabo con la ayuda de una

lente quirúrgica (estereo microscopio M651, Leica, Alemania). Una vez que se monitorizó al animal y se comprobó que sus constantes vitales eran estables se comenzó con la cirugía torácica. La finalidad de este proceso fue llevar a cabo una oclusión reversible de ADA y conseguir así el IM. Previamente a la apertura de tórax se administró vía intraperitoneal heparina sódica diluida en NaCl al 0.9% (200 UI/Kg). Con esto se evitó la formación de coágulos en las arterias coronarias y se permitió la completa perfusión miocárdica después de liberar el punto ocluyente.

El procedimiento quirúrgico se ha basado en el modelo de I/R miocárdica realizado en rata en nuestro laboratorio y en diferentes modelos descritos en la literatura (10, 11, 14, 15, 26). Se colocó al animal en posición supina ligeramente lateralizado, se fijó con cinta micropore (3M, Estados Unidos) a la tala quirúrgica situada sobre la manta eléctrica y se desinfectó la zona expuesta a la cirugía con alcohol de 96°. La apertura de tórax se realizó mediante una técnica de disección roma utilizando unas tijeras quirúrgicas para microdisección y un fórceps. Se llevó a cabo una minitoracotomía izquierda a la altura del 4º espacio intercostal y una vez abierto el tórax, se separaron las costillas con la ayuda de un retractor para microcirugía. El cuarto espacio intercostal se identifica por un pequeño vaso que nutre el músculo pectoral menor originado en esa zona y por el espacio entre el lóbulo inferior y el lóbulo superior del pulmón izquierdo. En este punto se debe tener especial cuidado de no dañar los pulmones del animal y la parte superior del esternón, donde se encuentra la confluencia de las venas bilaterales largas. Seguidamente se eliminó parte del pericardio con la ayuda de una minitórula quirúrgica y se procedió a localizar ADA.

La identificación de ADA es probablemente el paso más crucial en el abordaje quirúrgico, ya que las arterias coronarias en ratón discurren por la parte interna del miocardio y no a lo largo de la superficie epicárdica. A partir de la aorta se originan la arteria coronaria descendente derecha y ADA (19, 20). ADA sigue principalmente dos patrones anatómicos (Fig 5): un primer patrón en el que la arteria transcurre hacia el ápex cardíaco como un único vaso principal del que nacen ramas de tamaño variable y apareciendo estas, en muchos casos, en posición horizontal con respecto a la rama principal; y un segundo patrón en el que ADA se bifurca en dos ramas principales que discurren hacia el ápex. Como el color de las arterias coronarias es similar al color del músculo cardíaco, la identificación de ADA sin manipulación es una etapa del protocolo de gran dificultad. Si no es posible identificar ADA mediante una fuente de luz modificable en intensidad, se puede aplicar una suave presión en el ápex cardíaco

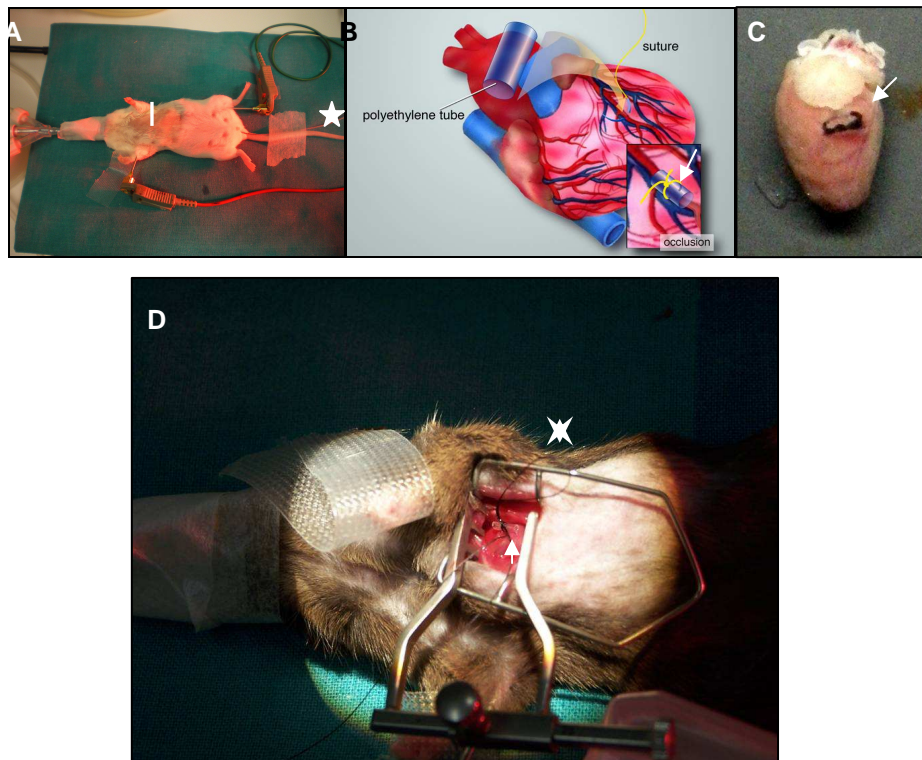
utilizando una tórula. Esta maniobra provoca una palidez del miocardio aumentando el contraste entre el tejido y los vasos sanguíneos, entre ellos ADA (14).



**Fig. 5.** Esquema de la anatomía de las arterias coronarias de ratón. Los tres corazones superiores muestran un patrón común en el que ADA desciende hacia el apex como un único vaso principal. Los tres corazones inferiores muestran otro patrón en el que ADA se bifurca en dos ramas principales y desciende hacia el apex. (10)

Una vez que se localizó ADA, se llevó a cabo el proceso de oclusión con el fin de obtener la isquemia transitoria deseada. Mediante el uso de un portaagujas para microcirugía e hilo de sutura de seda 6-0 con aguja BV-1 atraumática (Ethicon, Jhonson & Jhonson. Estados Unidos) se pasó un punto de oclusión aproximadamente a 1-2 mm del vértice de la aurícula izquierda cuando esta se encuentra en su posición normal (15). Finalizado el paso del punto de oclusión, se llevó a cabo un nudo doble y se acercó lo máximo posible al corazón, para seguidamente introducir un tubo de polietileno PE-50 de 3-4 mm de longitud a modo de tubo oclisor y protector del miocardio evitando con esto la rotura del músculo cardíaco (Fig. 6, B y C).





**Fig. 6.** **A**, ratón ventilado antes de comenzar el proceso quirúrgico. La línea muestra la zona anatómica donde se encuentra el 4º espacio intercostal. La estrella señala la sonda rectal de control de temperatura. **B**, oclusión de ADA con la ayuda de un tubo de polietileno PE-50. El punto de oclusión transitoria (marcado por la flecha) se llevó a cabo con hilo de sutura de seda de calibre 6-0 (en color amarillo) (8). **C**, punto de oclusión (flecha) situado a 1-2 mm de la punta de la aurícula izquierda en su posición normal. **D**, colocación del tubo PE-50 (flecha) y el nudo corredizo (asterisco) que lo fija a la zona donde se ocluye ADA.

Una vez hecho esto, se apretó el nudo con la consiguiente oclusión de ADA y se efectuó un nudo corredizo para, por una parte fijar el nudo doble al tubo ocluidor, y por otra posibilitar que la oclusión fuera transitoria y permitir ciclos de I/R (precondicionamiento isquémico) si el experimento así lo requiriera (Fig. 6, D). El comienzo de la isquemia se verificó en el ECG donde se observó una elevación del segmento ST a los pocos segundos de la oclusión coronaria (26). Durante el tiempo que duró la isquemia se cubrió el tórax abierto del animal con una gasa quirúrgica empapada en NaCl al 0.9% a 37 °C. Para dar paso al periodo de perfusión se liberó el nudo corredizo efectuado anteriormente y se extrajo el tubo ocluidor PE-50 restaurándose así el flujo coronario. En la perfusión se observó un descenso progresivo del segmento ST corroborando la correcta reanudación del flujo coronario (26). Al finalizar la oclusión transitoria y comenzar la perfusión se cerró el tórax del animal con el fin de evitar pérdidas de agua, electrolitos y de restaurar la presión negativa intratorácica. Utilizando un hilo de sutura de seda 6-0 (Aragon, España) se pasó un punto intercostal

fijándolo con un nudo triple y se dejó una longitud determinada del hilo de seda utilizado para la oclusión en la cavidad torácica. Al mismo tiempo que se apretaba el nudo triple, se ejerció una ligera presión sobre el tórax y el vientre del animal para eliminar el posible aire residual de la cavidad torácica y evitar un neumotórax. Con la caja torácica ya cerrada se suturaron las capas musculares y la piel mediante una sutura discontinua. El resto del hilo 6-0 de seda usado en la oclusión coronaria se colocó entre la caja torácica y la piel. Al finalizar la sutura se desinfectó la zona con alcohol de 96°.

Ya con el animal suturado se cambió el ventilador a modo de ventilación asistida para agilizar la extubación progresiva. Mediante este modo, el ventilador envía golpes respiratorios al roedor de forma que permite al animal competir con el ventilador y forzarle a que comience a ventilar por si mismo. Además, en este momento se mezcló en la ventilación un 50% O<sub>2</sub> con un 50% de aire ambiental. Con todo esto se consiguió que el animal respirase de forma independiente siendo posible la desconexión del ventilador y la extubación. Durante el tiempo transcurrido hasta la extubación del animal se mantuvo un control de la temperatura y del ECG.

## ***6. Tratamiento postquirúrgico***

En el momento en el que el animal rechazó la cánula de intubación y comenzó a respirar de forma independiente se le colocó aislado en una jaula previamente calentada con una manta eléctrica para evitar contaminación en la zona quirúrgica o daño causado por otros animales. Con el fin de impedir que el animal aspirara de forma accidental la viruta de la jaula se colocó una toalla de papel entre éste y la viruta durante el tiempo de recuperación. Además, se le suministró oxígeno hasta que comenzó a moverse y a respirar con normalidad. Se sometió al animal a tratamiento antibiótico profiláctico suministrando una única dosis de cefazolina (Tasep, IPS Farma, España) vía subcutánea, a una concentración de 80 mg/Kg. Además, se efectuó un tratamiento analgésico con buprenorfina hidrocloreto (Buprex, Merck & Co. Inc., Estados Unidos) vía subcutánea, a una concentración de 0.01 mg/Kg cada 12 horas y durante las 48 horas siguientes al fin del protocolo quirúrgico.

## 7. Procesado de los corazones

En los modelos de I/R miocárdica in vivo en ratones la cuantificación del tamaño del infarto es de gran importancia. Para ello se debe extraer el corazón del animal infartado y someterlo a un estricto protocolo.

Previamente al anestesiado del animal se prepararon una serie de soluciones necesarias para el protocolo de procesado (Tabla 2).

**Tabla 2: Soluciones utilizadas en el procesado del corazón.**

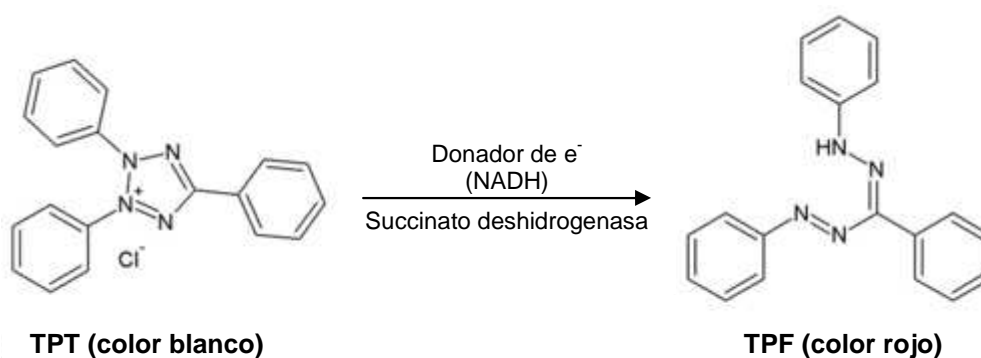
Solución	Referencia	Composición	Caducidad	Conservación
Azul de Evan	Sigma	5% en NaCl al 0.9%	Semanal	4 °C
PBS	Sigma	1 pastilla comercial de PBS, 200 mL H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> estéril	Semanal	4 °C
TTC 1%	Sigma	1 g TTC, 100 mL PBS	Diaria	4 °C
Formalina tamponada 10%		100 mL Formaldehído 40%, 900 mL H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> estéril, 4 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 6.5 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> anhidro	Mensual	Temperatura ambiente

PBS, tampón fosfato salino.

TTC, Cloruro de Trifeniltetrazolio.

H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, agua destilada.

Se preparó solución de tinción azul de Evan (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) al 5% en solución fisiológica con NaCl al 0.9% utilizada para demarcar el AR obtenida a causa de la oclusión de ADA. Con este colorante se marca de color azul toda la parte del corazón que no depende de la irrigación de ADA, es decir, la parte no infartada, mientras que la parte correspondiente al AR aparece de color rojo pálido-blanquecino. Se preparó tampón fosfato salino (PBS, Sigma-Aldrich, Estados Unidos) que se utilizó para la preparación del colorante Cloruro de Trifenil Tetrazolio (TTC, Sigma-Aldrich, Estados Unidos). El TTC se utilizó para marcar la zona infartada del miocardio (Fig. 7). Este compuesto es un indicador redox utilizado para diferenciar entre tejido metabólicamente activo, que aparece coloreado en rojo debido a la reacción de deshidrogenación que sufre el colorante facilitada por la presencia de NADH, y tejido metabólicamente inactivo, que en este caso aparece de color pálido blanquecino debido a la ausencia de coloración a causa de una menor producción de NADH que desemboca en una menor actividad deshidrogenasa. Por último se preparó una solución de tampón formalina al 10% que se utilizó para remarcar la zona infartada fijando la tinción previa con TTC.



**Fig. 7.** Mecanismo de acción del TTC (*2,3,5-triphenyltetrazolium chloride*). El compuesto de color blanco (TPT, trifeniltetrazolio) es reducido enzimáticamente a TPF (trifenilformazán) de color rojo mediante la acción de varias deshidrogenasas en los tejidos vivos, mientras que se mantiene como TTC blanco en las zonas de necrosis donde estas enzimas se han desnaturalizado, degradado o no disponen de una fuente donadora de  $e^-$  necesaria para la reacción.

Transcurridas 24 horas de reperusión se anestesió y se intubó endotraquealmente al animal como se describió anteriormente. En esta parte del protocolo la dosis de anestesia utilizada no superó la mitad de la dosis de inducción administrada al comienzo del protocolo. Esto se debe a que el animal se encuentra infartado por lo que una dosis alta de anestésico podría ser letal. Como complemento anestésico se suministró isoflurano al 1%. Para el proceso de intubación, a las 24 horas de reperusión el ratón fue sometido a una traqueotomía ya que la glotis en ese momento aparece alterada. Se monitorizó al animal para controlar su temperatura y sus parámetros cardíacos, además de conectarlo a la ventilación asistida. Con el animal ventilado, se procedió a la canulación de la arteria carótida a través de la cual, tras recluir ADA, se infundió 1 mL de azul de Evan al 5%. A continuación, se abrió el tórax del animal a través de los puntos de sutura dados previamente y utilizando el mismo material quirúrgico detallado anteriormente. Se realizó una incisión a nivel de la cavidad abdominal y se apartó el diafragma. Con la ayuda de unas pinzas de punta roma, se recogió el hilo de seda 6-0 usado en la oclusión en dirección al corazón para sacarlo del espacio entre la piel y las costillas y facilitar así la posterior reoclusión de ADA. Se procedió a reanudar el hilo y se comprobó en el ECG la elevación del segmento ST. Inmediatamente después, se infundió el colorante azul de Evan vía arteria carótida de forma rápida y continua. En el caso de que la perfusión del colorante sea correcta se observará un área ausente de tinción azul correspondiente a la zona irrigada por ADA y, por lo tanto, considerada AR. Inmediatamente después de administrar el colorante se extrajo rápidamente el corazón y se colocó en NaCl al 0.9% previamente

congelado. Se lavó utilizando una jeringa con aguja 25G e infundiendo NaCl al 0.9% a través de los grandes vasos. A continuación, se limpió eliminando las aurículas y la vena pulmonar, se depositó en un molde de metacrilato (Zivic Labs, Estados Unidos) graduado para realizar cortes de 1 mm de espesor mediante cuchillas de un solo filo. Las lonchas obtenidas se numeraron desde la parte más basal a la parte más apical, de forma que la loncha L1 se correspondería con la parte basal del corazón. Se introdujeron las lonchas en la solución de TTC al 1% y se incubaron durante 5 minutos en baño con agitación (Grant OLS 200, Reino Unido) a 37 °C en una placa de 6 pocillos. Una vez terminado el período de incubación en TTC se pesaron las lonchas de forma individual en balanza de precisión, se colocaron en PBS y se fotografiaron por ambas caras. Seguidamente se incubaron en tampón formalina al 10% durante 12 horas. Este paso potencia el contraste entre las zonas necróticas y las zonas no necróticas de tejido (21). Finalmente se volvieron a fotografiar como se ha descrito anteriormente y la loncha más representativa del infarto (normalmente la loncha L3 o la L4) se preservó en formol al 10% para posteriormente incluirla en parafina y llevar a cabo estudios histológicos.

### ***8. Determinación del Área en Riesgo (AR) y del Área de Infarto (AI)***

Después de la coloración descrita anteriormente se identificaron tres zonas claramente delimitadas en las lonchas: una zona pálida correspondiente al AI, una zona roja correspondiente al AR y una zona azul correspondiente al resto del tejido cardíaco no comprometido por la oclusión. Cada una de las lonchas se midió mediante planimetría utilizando un programa informático (Image-Pro Plus 4.5.0.29, Media Cybernetics, Estados Unidos) y un investigador del laboratorio ajeno al protocolo se encargó de cuantificar las áreas por ambas caras de cada loncha. El AI en gramos de cada loncha se calculó de la siguiente manera:  $AI (g) = \text{Área infartada de la loncha} / \text{Área total de la loncha} \times \text{Peso de la loncha (g)}$ . El AR (g) de cada loncha se calculó de la misma manera que el AI (g). El tamaño del infarto o AI del corazón se expresó en porcentaje como tamaño de la necrosis en relación con el AR y se calculó de la siguiente manera:  $AI/AR (\%) = \sum AI \text{ de cada loncha} \times 100 / \sum AR$ .

### ***9. Cálculo del edema tisular***

Se efectuó el cálculo del edema en el tejido pulmonar y en el tejido cardíaco. En ambos casos el procedimiento fue el mismo. En el procesado del animal (ver párrafos

anteriores) se extrajeron tanto los pulmones como el corazón. Un fragmento de pulmón y una de las lonchas de corazón obtenidas se pesaron en balanza de precisión y se colocaron en una estufa (Selecta, España) a 100 °C durante 12 horas. Una vez que se obtuvieron estos datos, el cálculo del edema tisular se llevó a cabo de la siguiente forma:  $(\text{Peso del tejido húmedo} - \text{Peso del tejido seco} / \text{Peso del tejido seco}) \times 100$ , obteniendo como resultado mL de agua por cada 100 mg de tejido seco.

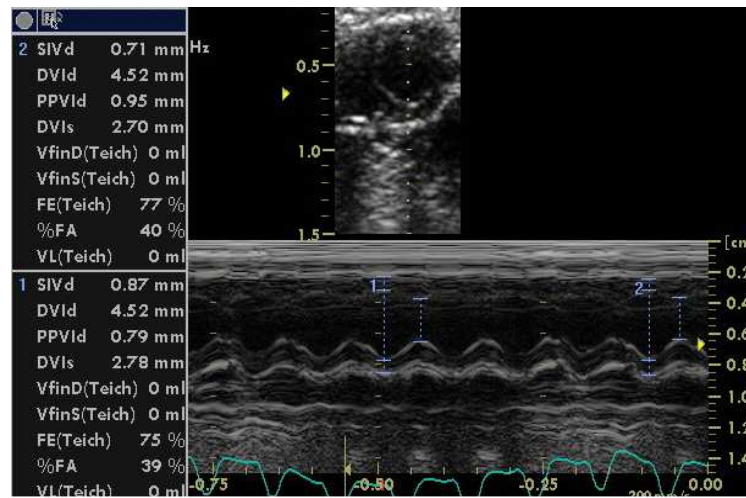
## **10. Hemodinámica**

En estudios de I/R conviene obtener datos de hemodinámica fieles y en tiempo real para controlar el estado del animal y posteriormente para calcular determinados parámetros de la función cardíaca. Para ello, durante este trabajo experimental se adquirió un aparato de medida de la función cardíaca Millar con un catéter de conductancia o de presión-volumen (catéter P-V) para ratón (Millar Instruments, Estados Unidos), un sistema de adquisición de datos MPVS Ultra (Millar Instruments, Estados Unidos) y el software Power Lab 4/30 con Chart Pro (AD Instruments Inc., Estados Unidos), mediante los cuales se podrán obtener variables del ECG, de presión y de volumen ventricular con alta precisión.

## **11. Ecocardiografía**

Se llevó a cabo un estudio ecocardiográfico con la finalidad de obtener medidas ecocardiográficas basales (antes de someter a los ratones al protocolo de I/R) y al final del período de reperfusión. Se utilizó un aparato para ecocardiografía VIVID Q (General Electric, Estados Unidos) con una sonda i12L-RS de 12 MHz. Se suministró a los animales una dosis anestésica de inducción del 50% de la dosis requerida para la cirugía, se controló su temperatura con ayuda de una manta térmica y se monitorizó el ECG. Las medidas se analizaron mediante ecocardiografía en modo M, siempre en el eje corto paraexternal (medio papilar) (Fig. 8). Se obtuvieron las medidas de análisis del ventrículo izquierdo (VI) que comprenden el grosor del septum intraventricular diastólico (SVId), el diámetro diastólico del ventrículo izquierdo (DVIId), el grosor de la pared posterior del ventrículo izquierdo en diástole (PPVId) y el diámetro sistólico del ventrículo izquierdo (DVIs). Con estos datos se calculó la fracción de acortamiento en porcentaje determinada por la ecuación  $FA = DVIId - DVIs / DVIId \times 100$ , y la fracción

de eyección (FE) en porcentaje dada por la ecuación  $FE = (DVID^3 - DVI^3) / DVID^3 \times 100$  (23).



**Fig. 8.** Estudio ecocardiográfico del VI de ratón en modo M en el eje corto paraexternal a nivel medio papilar.

## 12. Eutanasia

El protocolo experimental llega a su fin una vez que concluye el período de reperfusión. En ese momento, se extrajo el corazón del animal para procesarlo como se ha descrito anteriormente y se llevó a cabo el exanguinado. En los casos en los que se observaron problemas relacionados con la salud del animal o un sufrimiento intolerable que superara los criterios de punto final establecidos en el modelo experimental presentado ante el CEEA, los animales se sacrificaron con una sobredosis anestésica de pentobarbital sódico seguida de la exanguinación.

## 13. Análisis estadístico

Las diferencias entre los grupos se analizaron mediante ANOVA de una vía. Los cambios a lo largo del tiempo se analizaron con ANOVA de medidas repetidas. La significación se fijó en un P-valor de 0.05. Los resultados están expresados como media  $\pm$  EEM (error estándar de la media).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Un total de 119 ratones, tanto ratones de la cepa C57BL/6NCrl como ratones CD1 White (ICR), han sido necesarios para conseguir un protocolo completo y reproducible. Dentro de estos animales están incluidos los utilizados para pruebas de anestesia, proceso de intubación, métodos quirúrgicos, protocolo postoperatorio o el procesamiento del corazón infartado, así como los animales muertos durante el proceso quirúrgico debido a diferentes circunstancias. En la tabla 3 se detallan los procesos clave junto con los problemas y las soluciones encontradas en el desarrollo del protocolo experimental. De forma general y salvo en los casos en los que se especifique lo contrario, los datos obtenidos se refieren a las dos cepas de ratones sin especificar diferencias entre ambas.

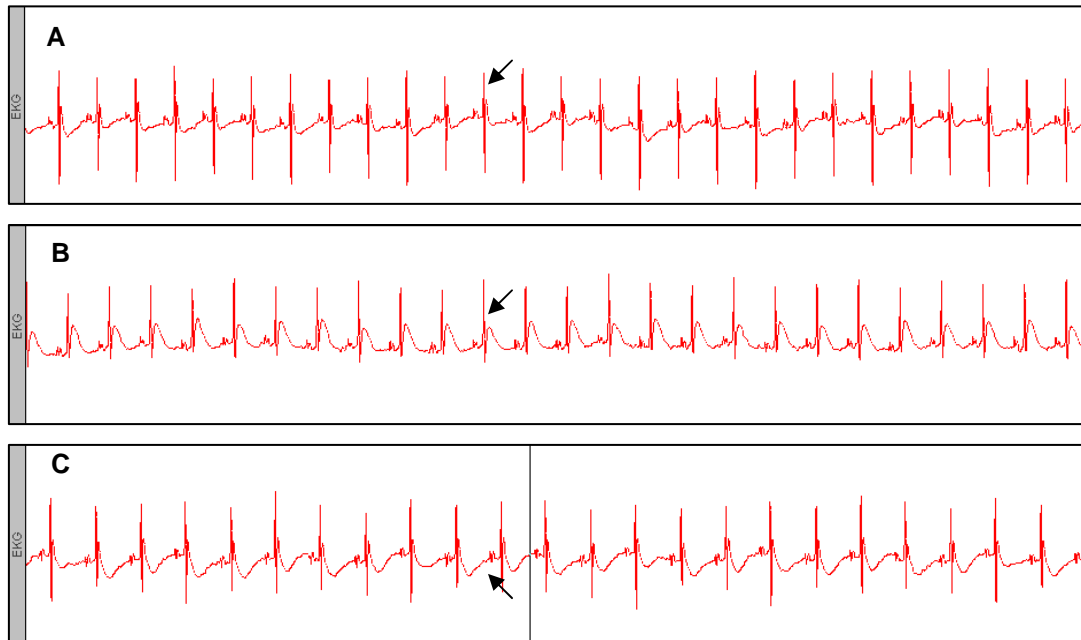
Se efectuaron estudios de control de profundidad anestésica adecuando el tipo de anestésico, la dosis inductora y la dosis de mantenimiento al tiempo de cirugía necesario en cada protocolo. Se probaron varios métodos de intubación endotraqueal (15, 16) y además se desarrolló un protocolo de traqueotomía para el procesado del animal al finalizar el proceso experimental (24). También se efectuaron pruebas de ventilación con parámetros como el Vt o la FR calculados automáticamente por el *safety mode* del propio ventilador o calculados mediante las siguientes fórmulas matemáticas:  $V_t \text{ (mL)} = 6.2 \times M^{1.01}$ , donde M es la masa del animal en Kg, y  $FR \text{ (min}^{-1}) = 53.5 \times M^{-0.26}$  (15).

La oclusión coronaria en las primeras fases del desarrollo del protocolo se realizó mediante un sistema de pesos colgantes utilizando un hilo de sutura 7-0 de polipropileno (14). Mediante este método se conseguía una oclusión de ADA reversible, sin embargo, los pesos desplazaban el corazón y causaban daño en el tejido miocárdico. Por este motivo se decidió realizar una oclusión transitoria de ADA mediante un nudo doble y un tubo PE-50 interpuesto como ya se ha descrito anteriormente.

La oclusión de ADA y la reperusión se comprobaron de varias formas (10). En primer lugar, visualmente, la región isquémica durante la oclusión debe aparecer de color pálido e hipocinética, además de producirse una elevación del segmento ST en el ECG (Fig. 9, B); mientras que en la reperusión se observa el enrojecimiento del VI debido al restablecimiento del flujo sanguíneo, la contractilidad y un descenso progresivo del segmento ST (Fig. 9, C). En segundo lugar, durante la oclusión el flujo sanguíneo disminuye de forma considerable y se ve reflejado en un descenso de la presión arterial, restableciéndose los parámetros normales en la reperusión. Además,



durante el restablecimiento del flujo coronario se ha visto un descenso significativo de la FC con respecto a la medida en el período basal (tabla 4). Este dato concuerda con algunos autores (29), aunque en otros trabajos no se han visto diferencias significativas (26).



**Fig. 9.** Cambios en el ECG durante el protocolo de I/R. La flecha señala el segmento ST antes de la oclusión (A), a los 7 minutos de colusión (B) y a los 3 minutos de reperusión (C). Durante la isquemia (B) se observa claramente una elevación del segmento ST del ECG y durante la reperusión (C) puede producirse una inversión de la onda T.

En las últimas etapas del desarrollo del protocolo se produjo un incremento en la aparición de arritmias potencialmente letales, pudiéndose producir tanto a los 10 minutos de dar comienzo la oclusión coronaria, como a los 10 minutos de comenzar la reperusión. Esto se debió al perfeccionamiento en la localización de ADA y a una mayor certeza en la colocación del punto de oclusión. Debido a esto, se pasó a conseguir en el 100% de los casos una oclusión con elevación del segmento ST reflejada en el ECG, pero por contra se ocluía una zona demasiado grande conllevando un riesgo de muerte asociado. En las fases finales del protocolo experimental el punto de oclusión se ha refinado de tal forma que la mortalidad por infarto de miocardio en ratón se ha situado en torno al 30%, estando este porcentaje dentro de la mortalidad descrita por otros autores (8, 28).

Tabla 3. Resolución de problemas

Proceso	Dificultad encontrada	Solución
Intubación endotraqueal.	No visualización de la glotis.	Asegurarse de que hay suficiente iluminación transtraqueal. Asegurarse de que la lengua está bien apartada y limpiar el exceso de mucosidad.
Canulación de arteria carótida.	Después de la disección y la ligadura, el vaso está colapsado y sin sangre. El catéter PE-10 se introduce en el vaso pero no avanza.	Apretar primero el nudo de la ligadura distal, a continuación, tensar el lazo de la ligadura proximal. Retroceder y avanzar el catéter con cuidado hasta que se introduzca en el vaso.
Control de temperatura e hidratación.	Quemaduras, rabdomiólisis, hipercalemia y muerte por deshidratación.	Administración de NaCl 0.9% vía subcutánea. Sustitución de manta eléctrica por lámpara infrarroja. Cierre de tórax en reperfusión.
Toracotomía.	Daño en el pulmón al realizar la toracotomía.	Utilizar instrumental romo. Lateralizar al animal hacia la izquierda y una vez abierto el tórax apartar el pulmón cuidadosamente hacia la izquierda mediante una minitórula, de forma que quede protegido por las costillas.
Ligadura de ADA.	No es posible la identificación de ADA.	Uso de fuentes adicionales de luz dirigidas tangencialmente al corazón. Identificar la vena que se origina en el margen caudal de la aurícula izquierda. ADA con frecuencia transcurre paralela a esta. Aplicar una breve y suave presión en el ápex cardíaco utilizando una tórula. Esta maniobra provoca una palidez del miocardio resaltando el color rojo de ADA.
	Hemorragia después de la ligadura.	Asegurarse de no penetrar en exceso en el miocardio durante el avance de la aguja.
	Infarto masivo por ligadura de ADA demasiado alta.	Asegurarse de realizar la ligadura 1-2 mm por debajo de la aurícula izquierda en su posición normal.
Oclusión.	Arritmias de oclusión potencialmente letales.	Masajear ligeramente el tórax o el corazón para revertir.
Cierre de tórax.	Neumotórax.	Asegurarse de expulsar el aire de la cavidad torácica antes de cerrar.
Reperfusión.	No descenso de ST.	Asegurarse de que el tubo PE-50 no ha dañado ADA. Administración de heparina previa a la oclusión.
Anestesia postreperfusión.	Arritmias de reperfusión potencialmente letales. Muerte por sobredosis anestésica.	Masajear ligeramente el tórax o el corazón para revertir. Administrar un 50% de la dosis anestésica utilizada en la inducción.

**Tabla 4. Temperatura rectal y frecuencia cardíaca en ratones C57BL/6NCrl y CD1 (ICR)**

	Basal	Apertura Tórax	Isquemia	Reperusión
<i>Temperatura (°C)</i>				
C57BL/6NCrl (n=10)	35.93 ± 0.30	36.46 ± 0.26	37 ± 0.13	36.95 ± 0.07
CD1 (ICR) (n=19)	36.18 ± 0.18	36.36 ± 0.14	36.32 ± 0.13	36.10 ± 0.12
<i>FC (BPM)</i>				
C57BL/6NCrl (n=9)	363.8 ± 10.20	381.0 ± 10.34	385.9 ± 21.03	329.1 ± 17.68*
CD1 (ICR) (n=16)	388.0 ± 12.24	379.27 ± 9.49	378.33 ± 14.11	341.11 ± 13.63*

FC, frecuencia cardíaca. BPM, latidos por minuto. Basal se corresponde con la medida después del anestesiado. Isquemia se corresponde con la medida 5 min después del comienzo de la oclusión. Reperusión se corresponde con la medida 5 min después del comienzo de la reperusión.

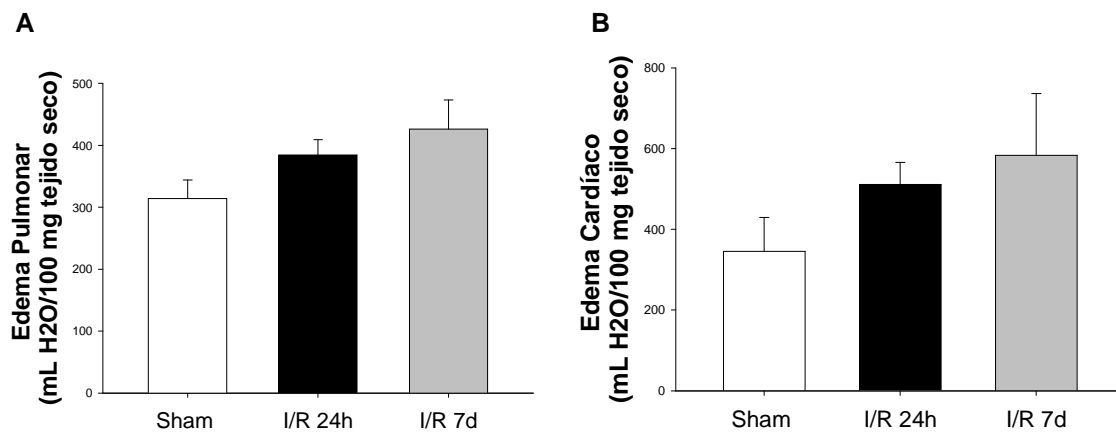
\*P < 0.05, respecto a basal.

Durante los primeros momentos del desarrollo del protocolo, el 90% de los ratones morían aproximadamente a los 60 minutos de reperusión y después de la aparición de respiraciones agónicas premortem (*gasping*) sin un motivo aparente. Se llevaron a cabo gasometrías arteriales durante la reperusión en las que se observó una elevación de los niveles plasmáticos de potasio (datos no mostrados). Esto, junto con el excesivo calentamiento de la manta eléctrica nos hizo concluir que la muerte de los animales podía deberse a la deshidratación o rabdomiólisis por sobrecalentamiento muscular. De este modo, cambiamos la manta eléctrica por una lámpara de infrarrojos, aumentamos la temperatura del quirófano y aplicamos el protocolo de hidratación descrito anteriormente.

El proceso de medida utilizando el catéter P-V está actualmente en desarrollo habiendo conseguido hasta la fecha configurar todo el hardware y el software proporcionado por el fabricante. Además, se han realizado algunas pruebas de canulación y medida con el catéter P-V (datos no mostrados). Más adelante, mediante este método se podrán obtener datos de presión arterial diastólica ( $Pa_d$ ), presión arterial sistólica ( $Pa_s$ ), presión arterial media (MAP), resistencia periférica total (TPR), presión al final de la diástole (PFD), presión al final de la sístole (PFS) o el gasto cardíaco (GC), así como datos para realizar el estudio de la función ventricular, como por ejemplo la elasticidad al final de la sístole ( $E_{es}$  o  $E_{max}$ ), utilizada como medida de la contractilidad del VI, o la relación con el tiempo del volumen al final de la diástole ( $dP/dt_{max}$ ), también utilizado como índice de contractilidad.

La cuantificación del edema pulmonar y del edema cardíaco se ha llevado a cabo tanto en ratones *sham* (n=5) como en ratones sometidos a un protocolo de I/R. Por el momento, hemos obtenido los datos de cuantificación para dos tipos de protocolos: 45

min de isquemia seguidos de 24 horas de perfusión (n=5) o 7 días de perfusión (n=5) respectivamente (Fig. 10). En ambos tejidos se ha podido observar un aumento de la cantidad de líquido en los ratones sometidos a una oclusión transitoria seguida de perfusión, siendo en mayor grado en los animales sujetos a un período de perfusión de 7 días. A pesar de observarse una tendencia al aumento del edema tisular tanto en corazón (P=0.067) como en pulmón (P=0.057) en los ratones sometidos a 7 días de perfusión, los resultados no son significativos.



**Fig. 10.** Edema pulmonar (A) y cardíaco (B) en ratones control (*Sham*), ratones sometidos a 45 min de isquemia seguidos de 24 horas de perfusión (I/R 24h) y ratones sometidos a 45 min de isquemia seguidos de 7 días de perfusión (I/R 7d).

Se ha realizado el estudio ecocardiográfico del VI en ratones *Sham* (n=5), ratones I/R 24h (n=5) y ratones I/R 7d (n=5) respectivamente (tabla 5). Se ha observado un descenso de la FE a las 24 horas de realizar la cirugía, dato que se corresponde con lo reportado en la bibliografía (25, 27, 30). Esta disminución de la FE persiste en las medidas ecocardiográficas realizadas a los 7 días posteriores al infarto. Este echo puede deberse a los procesos de remodelado ventricular que se llevan a cabo en el corazón después de un acontecimiento de I/R y relacionarse con un deterioro en la función ventricular.

Tabla 5. Datos ecocardiográficos

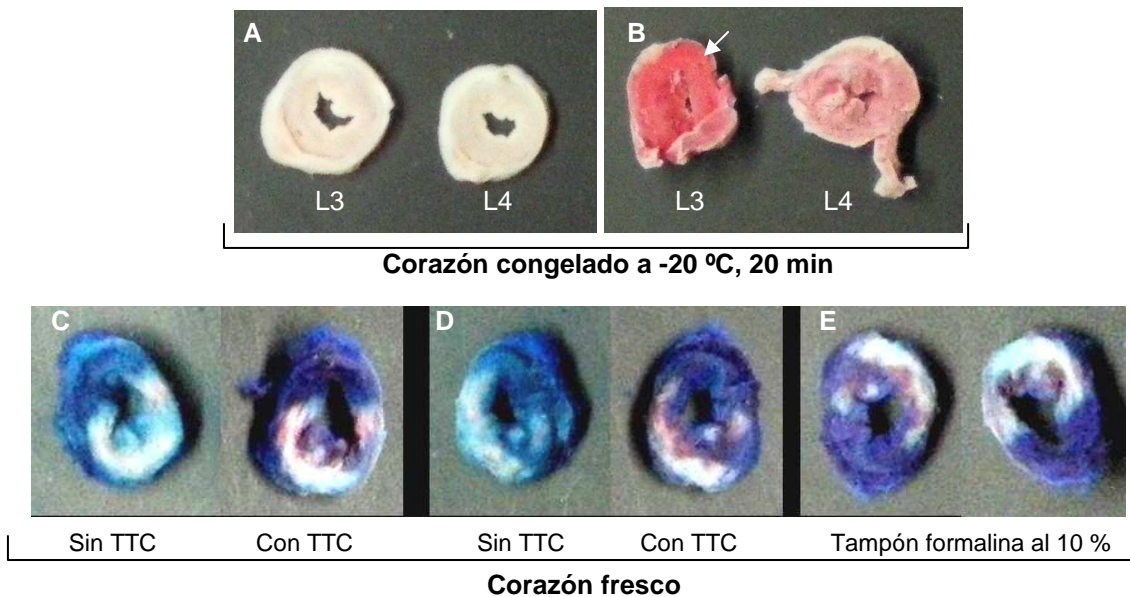
	<i>Sham</i> (n=5)	I/R 24h (n=5)	I/R 7d (n=5)
FC (BPM)	463.6 ± 35.3	496 ± 34.5	414.5 ± 33.5
SVId (mm/g)	0.032 ± 0.03	0.019 ± 0.06	0.025 ± 0.04
DVId (mm/g)	0.123 ± 0.018	0.123 ± 0.028	0.129 ± 0.08
PPVId (mm/g)	0.025 ± 0.03	0.023 ± 0.06	0.020 ± 0.012
DVIs (mm/g)	0.069 ± 0.014	0.086 ± 0.021	0.089 ± 0.016
FE (%)	80.3 ± 3.3	64.2 ± 3.1*	56.4 ± 3.9**
FA (%)	43.3 ± 3.3	30.3 ± 1.9	31.5 ± 8.5

*Sham*, ratones sin oclusión de ADA. I/R 24h, ratones sometidos a 45 min de isquemia seguida de 24 horas de perfusión. I/R 7d, ratones sometidos a 45 min de isquemia seguida de 7 días de perfusión. FC, frecuencia cardíaca. SVId, diámetro del septum intraventricular diastólico. DVId, diámetro diastólico del ventrículo izquierdo. PPVId, diámetro de la pared posterior del ventrículo izquierdo en diástole. DVIs, diámetro sistólico del ventrículo izquierdo. FE, fracción de eyección. FA, fracción de acortamiento.

\* $P < 0.05$ , diferencias respecto a *Sham*.

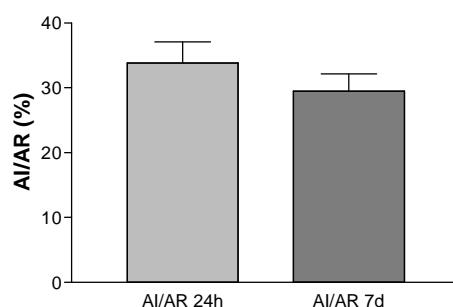
\*\* $P < 0.05$ , diferencias respecto a *Sham*.

Durante la fase de procesamiento del corazón se probaron los colorantes y sus concentraciones para la tinción del AR y de la zona isquémica o necrótica (21, 25) y se desarrolló el método de corte del corazón en lonchas para la posterior cuantificación del AR y del AI. El enfriado o congelado del corazón como se describe en varios artículos (14, 21) puede provocar la aparición de zonas TTC negativas de forma que podría verse alterada la cuantificación del área infartada (Fig. 11, A y B). También la inclusión del corazón en gelatina o agarosa para mejorar el corte de las lonchas puede desencadenar estas áreas TTC negativas además de alterar el tejido miocárdico, ya que estas sustancias se añaden al corazón relativamente calientes. En la figura 11, C, D y E, se pueden observar las lonchas procesadas de un corazón de ratón sometido a 45 min de isquemia seguida de un período de 24 horas de perfusión. Aquí se diferencia perfectamente la parte del tejido miocárdico salvada (en color rojo) y la zona necrótica (en color blanco). También se observa que al someter las lonchas a la fijación de la tinción con el tampón formalina 10% aumenta el contraste entre las zonas necróticas y las zonas con tejido vivo (Fig. 10, E). Además, las propiedades anfipáticas de la formalina hacen que esta elimine los ácidos grasos del tejido, los cuales pueden reducir el contraste en las fotografías (21).



**Fig. 11.** Lonchas de corazón procesadas. Todos los corazones aquí reflejados han sido sometidos a 45 min de isquemia seguidos de 24 horas de reperusión. **A**, lonchas blancas en su totalidad debido a la aparición de zonas TTC negativas. **B**, comparación de dos lonchas de un mismo corazón no afectada (flecha) y afectada por la tinción TTC negativa. **C**, **D** y **E** se corresponden con lonchas sin congelar sometidas a TTC y tampón formalina 10%. En las lonchas no teñidas con TTC aparece en blanco el AR y en azul el resto del tejido miocárdico. En las lonchas teñidas con TTC aparece en blanco la zona necrótica, en rojo el tejido salvado y en azul el resto del miocardio. En las lonchas tratadas con tampón formalina 10% se observa la zona necrótica resaltada frente a las lonchas sin tratar con este tampón.

Por el momento, hemos obtenido los datos de cuantificación para dos tipos de protocolos diferentes: 45 min de isquemia seguida de 24 horas (I/R 24h, n=5) o 7 días de reperusión (I/R 7d, n=5) respectivamente. Tenemos unos valores de AI/AR de  $33.84 \pm 3.26\%$  en los ratones I/R 24h y de  $29.48 \pm 2.68\%$  en los ratones I/R 7d (Fig. 12). Para el AR también se han obtenido unos valores similares para ambos protocolos de I/R (datos no mostrados) constatando la reproducibilidad de la técnica de oclusión.



**Fig. 12.** AI/AR (%) en ratones sometidos a 45 minutos de isquemia seguidos de 24 horas de reperusión (24h) o 7 días de reperusión (7d).

Del mismo modo que se ha descrito en la literatura, la ausencia de diferencias significativas en el tamaño del infarto entre los dos grupos para un período de isquemia de 45 minutos parece indicar que el tamaño del infarto queda definido tras las primeras 24 horas de reperusión (21, 26)

## CONCLUSIONES

En este trabajo experimental nuestro laboratorio ha desarrollado un modelo de I/R miocárdica *in vivo* en ratones. Con este modelo se ha conseguido con una elevada reproducibilidad un tamaño de infarto similar al descrito por otros autores. Además, la tasa de mortalidad obtenida tras definir la técnica quirúrgica se ajusta del mismo modo que el tamaño del infarto a lo reportado en la literatura (10, 14, 15, 26).

A diferencia de otros modelos experimentales menos fisiológicos (por ejemplo, corazones en sistema Langendorff o cultivos celulares), el modelo *in vivo* de I/R reproduce a nivel experimental de una manera más exacta la patología del IM en pacientes. Otro de los aspectos a tener en cuenta del modelo es que posibilita la inducción de un IM en grado variable dependiendo del criterio del investigador o de la naturaleza de cada protocolo experimental, y además, permite la administración aguda o crónica de drogas, fármacos u otras sustancias vía intraperitoneal (IP), intravenosa (IV) o subcutánea (SC) en el animal infartado.

En nuestro laboratorio se lleva a cabo un protocolo de I/R miocárdica porcino en el que se somete al animal a un período de reperfusión de 2 horas. Realizar períodos prolongados de reperfusión en cerdos supone un elevado coste económico, además de problemas éticos derivados de los complejos cuidados postoperatorios a los que sería necesario someter al animal. Es por ello que el modelo porcino se limita al estudio de los mecanismos iniciales del daño por reperfusión. En este trabajo se han realizado protocolos de I/R en ratón con tiempos de reperfusión de hasta 7 días, aunque actualmente se desarrollan reperfusiones de 28 a 30 días (datos preliminares no mostrados). Estos tiempos prolongados de reperfusión en el modelo murino, abren un amplio abanico de nuevas posibilidades de investigación ya que permitirán realizar estudios de remodelado ventricular, análisis de la respuesta inflamatoria en el daño por reperfusión a largo plazo o el estudio de la expresión de proteínas, todos ellos parámetros asociados a la reperfusión miocárdica que no pueden ser analizados en ninguno de los modelos de los que actualmente dispone nuestro laboratorio.

Para nuestro grupo experimental tiene un gran interés el hecho de que el modelo desarrollado permita el uso de ratones transgénicos con el objetivo de examinar el impacto de la ausencia o la sobreexpresión del producto de un gen en la progresión del daño y la inflamación posteriores a la I/R miocárdica. A día de hoy nuestro laboratorio

posee diferentes líneas de ratones transgénicos para proteínas que intervienen de alguna manera en el proceso de I/R (Cx43KiCx32, Knock-in para la conexina 43, y Cx43fl/fl/Cx43Cre-ER(T)/fl, knock-out inducibles también afectados en la conexina 43, para la Ciclofilina D y ratones con sobreexpresión selectiva de COX-2).

Por último, utilizando el modelo de I/R miocárdica *in vivo* en ratón descrito en este trabajo experimental, se desarrollará un estudio experimental en un modelo de ratón diabético de tipo II (DM-II) criado en nuestro laboratorio. Nuestro objetivo será evaluar las alteraciones en el remodelado ventricular y sus mecanismos fisiopatológicos asociados a la diabetes. Para tal fin, se someterá a los ratones DM-II al protocolo de I/R desarrollado en este trabajo experimental con un período de reperfusión de 28 días.



## BIBLIOGRAFÍA

1. Garcia-Dorado D. Myocardial cell protection in acute coronary syndromes. *In Acute Coronary Syndromes. A Companion to Braunwald's Heart Disease* (2003) 453-472.
2. Piper H. M., Garcia-Dorado D., Ovize M. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res* (1998) 38 (2): 291-300.
3. Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation*. (2001) 104 (3): 365-72.
4. Lee K. T., Jarmolych J., Kim D. N., Grant C., Krasney J. A., Thomas W. A.,. Production of advanced coronary atherosclerosis, myocardial infarction and "sudden death" in swine. *Exp Mol Pathol* (1971) 15: 170-190.
5. Wilson R. B., Hartroft W. S. Pathogenesis of myocardial infarcts in rats fed a thrombogenic diet. *Arch Pathol* (1970) 89: 457-469.
6. Bond M. G., Bullock B. C., Bellinger D. A., Hamm T. E. Myocardial infarction in a large colony of nonhuman primates with coronary artery atherosclerosis. *Am J Pathol* (1980) 101: 675-692.
7. Chu G., Haghighi K., Kranias E. G. From mouse to man: understanding heart failure through genetically altered mouse models. *J Card Fail* (2002) 8: S432-S449.
8. Klocke R., Tian W., Kuhlmann M. T., Nikol S. Surgical animal models of heart failure related to coronary heart disease. *Cardiovasc Res*. (2007) 1; 74 (1): 29-38.
9. Zolotareva AG, Kogan ME. Production of experimental occlusive myocardial infarction in mice. *Cor Vasa*. (1978) 20: 308-314.
10. Michael L. H., Entman M. L. *et al*. Myocardial Ischemia and reperfusion: a murine model. *Am J Physiol*. (1995) 269 (6 Pt 2): H2147-54.
11. Hernando V., Inserte J., Sartório C. L., Parra V. M., Poncelas-Nozal M., Garcia-Dorado D. Calpain translocation and activation as pharmacological targets during myocardial ischemia/reperfusion, *J Mol Cell Cardiol*. (2010).
12. Patten R. D., Aronovitz M. J., Deras-Mejia L., Pandian N. G., Hanak G. G., Smith J. J., Mendelsohn M. E., Konstam M. A. Ventricular remodeling in a mouse model of myocardial infarction. *Am J Physiol*. (1998) 274 (5 Pt 2): H1812-20.
13. Modi N. Management of fluid balance in the very immature neonate. *Arch Dis Child Fetal Neonatal*. (2004) 89 (2): F108-11.
14. Eckle T., Grenz A., Köhler D., Redel A., Falk M., Rolauffs B., Osswald H., Kehl F., Eltzschig H. K. Systematic evaluation of a novel model for cardiac ischemic preconditioning in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. (2006) 291 (5): H2533-40.
15. Tarnavski O., McMullen J. R., Schinke M., Nie Q., Kong S., Izumo S.. Mouse cardiac surgery: comprehensive techniques for the generation of mouse models of human diseases and their application for genomic studies. *Physiol Genomics*. (2004) 13; 16 (3): 349-60.

16. Brown R. H., Walters D. M., Greenberg R. S., Mitzner W. A method of endotracheal intubation and pulmonary functional assessment for repeated studies in mice. *J Appl Physiol.* (1999) 87: 2362-2365.
17. Berul C. I., Aronovitz M. J., Wang P. J., Mendelsohn M. E.. In vivo cardiac electrophysiology studies in the mouse. *Circulation.* (1996) 94 (10): 2641-8.
18. L. A. Schwarte, C. J. Zuurbier, C. Ince. Mechanical ventilation of mice. *Basic Res Cardiol* (2000) 95: 510-520.
19. Kumar D., Hacker T. A., Buck J., Whitesell L. F., Kaji E. H., Douglas P. S., Kamp T. J. Distinct mouse coronary anatomy and myocardial infarction consequent to ligation. *Coron Artery Dis.* (2005) 16 (1): 41-4.
20. Icardo J. M., Colvee E. Origin and course of the coronary arteries in normal mice and in iv/iv mice. *J Anat.* (2001) 199 (Pt 4): 473-82.
21. Bohl S., Medway D. J., Schulz-Menger J., Schneider J. E., Neubauer S., Lygate C. A. Refined approach for quantification of in vivo ischemia-reperfusion injury in the mouse heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* (2009) 297 (6): H2054-8.
22. Janet Hoff. Methods of blood collection in the mouse. *Lab Animal.* (2000) 29, no 10.
23. Yuji K., Kouichi T., Takuya D., Mikio N., Ryo O., Yoshihisa N., Satoshi Y. Preferable anesthetic conditions for echocardiographic determination of murine cardiac function. *J. Pharmacol Sci.* (2005) 99, 95-104.
24. Pacher P., Nagayama T., Mukhopadhyay P., Bátkai S., Kass D. A. Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats. *Nat Protoc.* (2008) 3 (9): 1422-34.
25. Elrod J. W., Calvert J. W., Morrison J., *et al.* Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci.* (2007) 104 (39): 15560-5.
26. Redel A., Jazbutyte V., Smul T. M., Lange M., Eckle T., Eltzschig H., Roewer N., Kehl F. Impact of ischemia and reperfusion times on myocardial infarct size in mice *in vivo*. *Exp Biol Med (Maywood)* (2008) 233 (1): 84-93.
27. Thibault H., Gomez L. *et al.* Acute myocardial infarction in mice: assessment of transmural by strain rate imaging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* (2007) 293 (1): H496-502.
28. Bayat H., Swaney J. S., Ander A. N., Dalton N., Kennedy B. P., Hammond H. K., Roth D. M. Progressive heart failure after myocardial infarction in mice. *Basic Res Cardiol.* (2002);97 (3): 206-13.
29. Diane L., Donna M. Ischemic preconditioning limits infarct size following regional ischemia-reperfusion in in situ mouse hearts. *Cardiovasc Res* (1999) 42 (3): 680-684
30. Finsen A. V., Christensen G., Sjaastad I. Echocardiographic parameters discriminating myocardial infarction with pulmonary congestion from myocardial infarction without congestion in the mouse. *J Appl Physiol.* (2005); 98 (2): 680-9.

## APÉNDICE

### Instrumental utilizado durante el proceso quirúrgico

Instrumental	Especificaciones	Finalidad	Referencia <sup>a</sup>
Tijeras de disección.	Punta roma, tipo 15.5 cm tamaño 6 1/8".	Todos los procesos de disección.	Martin, 11-365-15
Pinza disección.	Rectas, 12 cm, 1x2 dientes.	Todos los procesos de disección.	Medicon, 06.21.12
Porta-agujas.	Con cerradura, recto, 11.5 cm.	Ligadura de la arteria coronaria y suturas.	Medicon, 10.12.11
Retractor.	3x3 dientes, 3 cm, máxima apertura 1.8 cm.	Separación de costillas, facilitar acceso al corazón.	F.S.T., 17003-03
Retractor de alambre.	Sin dientes, máxima apertura 1.5 cm.	Separación de piel y tejido muscular.	F.S.T., 17000-03
Pinza microcirugía.	Curva, dentada, 10 cm.	Ligadura de la arteria coronaria. Canulación de la arteria carótida y de la vena yugular. Traqueotomía.	Medicon, 07.55.20
Pinza microcirugía.	Curva, 11.5 cm.	Ligadura de la arteria coronaria. Canulación de la arteria carótida y de la vena yugular. Traqueotomía.	Medicon, 07.60.07
Pinza disección.	Recta, dentada, 10 cm.	Ligadura de la arteria coronaria.	Medicon, 07.55.10
Pinza mosquito.	Recta, dentada, con cerradura, 13 cm.	Canulación de la arteria carótida y de la vena yugular.	Elcon, 151-113
Tijeras tipo cinta.	Punta afilada, rectas, anillos extragrandes, 10 cm.	Traqueotomía.	Medicon, 02.50.22
Pinza hemostática.	Curva, dentada, 10 cm.	Canulación de la arteria carótida y de la vena yugular.	Dimeda, 12.211.10
Pinza hemostática.	Curva, dentada, 12.5 cm.	Canulación de la arteria carótida y de la vena yugular.	Dimeda, 12.221.12
Tijeras microcirugía.	Punta afilada, recta, 8 cm.	Canulación de la arteria carótida y de la vena yugular.	F.S.T., 15000-08
Pinza Dumont 5-45.	Punta angulada 45°, 11 cm.	Introducción de la cánula en la arteria carótida y la vena yugular.	F.S.T., 11253-25

<sup>a</sup> Utilizando la referencia se puede obtener una descripción detallada de cada instrumento dirigiéndose a la página web del fabricante.  
F.S.T., *Fine Science Tools*.